

藁本内酯对脑缺血再灌注大鼠中性粒细胞胞外诱捕网的影响

吴倩^{1,2}, 汪杨², 周家宁¹, 万社含^{2,3}, 胡可¹, 黄琪², 汪宁^{2,3*}

(1. 安徽中医药大学 中西医结合学院, 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学 中药复方安徽省重点实验, 合肥 230012; 3. 安徽中医药大学 中药研究与开发安徽省重点实验室, 合肥 230012)

[摘要] 目的:探讨藁本内酯(LIG)通过抑制中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)释放、促进血脑屏障修复及减轻缺血后神经炎症,从而对缺血性脑卒中(IS)发挥神经保护作用的可能机制,为IS治疗提供新方向。方法:采用大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,分为假手术(Sham)组、模型(Model)组, LIG低、高剂量组(20、40 mg·kg⁻¹), NETs抑制剂CI-amidine组(CI-amidine, 10 mg·kg⁻¹)组, 给药治疗3 d。通过四唑红(TTC)染色、神经功能评分及脑指数检测,评估大鼠缺血后的神经损伤情况;通过流式细胞术及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测分析中性粒细胞的表达变化;利用免疫荧光技术观察NETs标志物H3Cit的荧光强度;Western blot检测血脑屏障紧密连接相关蛋白及炎症因子白细胞介素-18(IL-18)、白细胞介素-1β(IL-1β)的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠脑组织明显损伤($P<0.05$),中性粒细胞数量及NETs表达明显上升($P<0.05$),血脑屏障通透性明显受损($P<0.05$),炎症因子表达明显升高($P<0.05$)。与模型组比较, LIG低、高剂量组可以显著减轻大鼠脑组织损伤($P<0.01$);抑制中性粒细胞数量及NETs的表达($P<0.01$);减轻血脑屏障损伤($P<0.01$);并抑制炎症因子IL-18和IL-1β的表达($P<0.01$),最终发挥神经保护作用。结论:LIG对脑缺血再灌注大鼠的神经保护作用,可能与抑制中性粒细胞及其诱导形成的NETs有关。

[关键词] 缺血性脑卒中; 藁本内酯; 中性粒细胞; 胞外诱捕网(NETs); 炎症

[中图分类号] R284;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)08-0082-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252209

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251010.1016.003>

[网络出版日期] 2025-10-10 14:28:47



Effect of Ligustilide on Neutrophil Extracellular Traps in Rats with Cerebral Ischemia-reperfusion Injury

WU Qian^{1,2}, WANG Yang², ZHOU Jianing¹, WAN Zhihan^{2,3}, HU Ke¹, HUANG Qi², WANG Ning^{2,3*}

(1. School of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Anhui Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Compounds, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 3. Anhui Province Key Laboratory of Research & Development of Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanisms by which ligustilide (LIG) exerts neuroprotective effects on ischemic stroke (IS) by inhibiting the release of neutrophil extracellular traps (NETs), promoting blood-brain barrier repair, and alleviating post-ischemic neuroinflammation, thereby providing a new direction for IS treatment. **Methods:** A middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established in rats. The rats were divided into the sham operation (Sham) group, model (Model) group, low- and high-dose LIG groups (20, 40 mg·kg⁻¹), and the NET inhibitor CI-amidine group (CI-amidine, 10 mg·kg⁻¹). Drug treatments were administered for 3 days. Neurological injury after ischemia was evaluated by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, neurological deficit scoring, and brain index measurement. Flow cytometry and

[收稿日期] 2025-07-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81903954,81773933);安徽高校自然科学研究重点项目(2024AH050964,KJ2020A0410);安徽省教育厅青年教师培育项目(YQYB2023010);中药复方防治脑病的应用基础研究安徽省高校优秀科研创新团队项目(2022AH010034);安徽省高校科研计划项目团队项目(2022AH010036)

[第一作者] 吴倩,博士,副教授,从事中医药防治缺血性脑卒中相关研究,E-mail:zyylebj3@163.com

[通信作者] *汪宁,博士,教授,从事中医药防治心脑血管相关机制研究,E-mail:wnhefei@163.com

Western blot were used to analyze changes in neutrophil expression. Immunofluorescence was used to observe the fluorescence intensity of the NET marker citrullinated histone H3 (H3Cit). Western blot was performed to detect the expression of blood-brain barrier tight junction-related proteins and inflammatory factors, including interleukin-18 (IL-18) and interleukin-1 β (IL-1 β). **Results:** Compared with the Sham group, the Model group exhibited significant brain tissue injury ($P<0.05$), significantly increased neutrophil numbers and NET expression ($P<0.05$), significantly impaired blood-brain barrier permeability ($P<0.05$), and significantly increased expression of inflammatory factors ($P<0.05$). Compared with the Model group, both low- and high-dose LIG significantly alleviated brain tissue injury in rats ($P<0.01$), inhibited neutrophil numbers and NET expression ($P<0.01$), reduced blood-brain barrier damage ($P<0.01$), and suppressed the expression of inflammatory factors IL-18 and IL-1 β ($P<0.01$), thereby ultimately exerting a neuroprotective effect. **Conclusion:** The neuroprotective effect of LIG in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury may be related to inhibition of neutrophils and the NETs induced by them.

[Keywords] ischemic stroke; ligustilide; neutrophils; neutrophil extracellular traps (NETs); inflammation

中枢神经系统的免疫调节已经成为目前缺血性脑卒中(IS)治疗的新策略。临床及基础研究发现,免疫细胞在卒中过程中被激活并募集到卒中部位,中性粒细胞是IS早期浸润到受损脑组织的“第一反应者”,天生具备炎症趋化性和跨血脑屏障能力,最先侵入和破坏脑组织^[1-2]。受到抗原刺激后的中性粒细胞被活化,导致多种蛋白酶移至中性粒细胞核内,将中性粒细胞核内染色质释放到胞外,形成网状结构的中性粒细胞胞外诱捕网(NETs),进一步吞噬杀灭其他病原体,修复损伤,是对抗感染条件的额外防御机制^[3]。尽管NETs有助于在感染期间清除病原体^[4],但NETs的过度释放也会导致IS血脑屏障的破坏及病理血栓的形成,加重炎症反应和继发性组织损伤^[5-6]。因此,靶向NETs可能成为IS治疗的新策略。

川芎为临床治疗卒中处方中常见配伍中药^[7-8],其中藁本内酯是其发挥药效的主要活性成分,实验研究发现,藁本内酯可以透过血脑屏障^[9-10],具有较好的脑靶向性,在治疗脑卒中等相关疾病中具有优势^[11-15]。课题组前期研究观察到中性粒细胞在梗死区的浸润表达,而藁本内酯的干预可以下调中性粒细胞蛋白表达,减轻炎症损伤,提示,中性粒细胞可能是藁本内酯减轻缺血后神经炎症的关键机制。本研究采用体内大脑中动脉栓塞(MCAO)/R法建立脑缺血再灌注模型,探讨藁本内酯对中性粒细胞及NETs的影响,为IS的免疫调控提供新的科学依据。

1 材料

1.1 药物及试剂 藁本内酯(成都德思特生物技术有限公司,批号81944-09-4,纯度 $\geq 98\%$)。500 mg藁本内酯,用聚山梨酯-80 100 mL稀释,配制成质量浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,避光,使用前使用生理盐水稀释至所需浓度。2%四唑红(TTC)染色液(美国Thermo公司,批号G3005);瓜氨酸组蛋白H3(CitH3)抗体(英国Abcam公司,批号ab5103);淋

巴细胞抗原6家族成员G6C(Ly6G)抗体、密封蛋白(Claudin)-5抗体、闭合蛋白(Occludin)抗体、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)抗体(美国Immounway公司,批号分别为YT7655、YT0953、YN2865、YN1410);白细胞介素(IL)-18抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号10663-1-AP);IL-1 β 抗体(北京安诺伦生物科技有限公司,批号YT5201);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号TA-08)。

1.2 动物 SPF级雄性SD大鼠,体质量(200 ± 20) g,由中国山东济南朋悦实验动物育种有限公司提供,合格证号SCXK(鲁)2019-0003。SD大鼠在温度 $22\text{ }^\circ\text{C}$,湿度55%的环境下饲养,饲养期间可自由获得食物和水。

1.3 伦理 动物实验经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准后开展(动物实验伦理学编号AHUCM-rats-2021030)。

1.4 仪器 D-37520型低温高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);IMS-60型制冰机(常熟市雪科电器有限公司);LQB-B-4型制冰机(南京先欧仪器制造有限公司);BHWY-100BC型恒温震荡摇床(常州杰博森仪器有限公司);YC-260L型 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱、DW-HL678型 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司);MCD-25L256型 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱(合肥美的生物医疗有限公司);AE2000型倒置显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);FA2004型天平(上海精密科学仪器有限公司);TANKPE060型超纯水仪(德国Millipore公司);MiniProtean Tetra型电泳仪、Mini Trans-Blot型转膜仪(美国Bio-Rad公司);Cytomics FC5000型流式细胞仪(美国Beckman公司)。

2 方法

2.1 MCAO/R大鼠模型的制备与给药 大鼠MCAO模型建立参考改良后的LONGA等^[16]线栓法进行制备。手术前1 d晚上开始禁食,术前腹腔注

射戊巴比妥钠($60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)进行麻醉,待大鼠处于麻醉状态,即刻对大鼠颈部剃毛并用碘伏消毒,眼科剪在正中偏右部位剪一小口,钝性分离出颈部肌肉组织,准确找到颈总、颈内及颈外动脉并结扎,除颈内动脉外。在颈总动脉近心端用眼科剪剪开切口,将硅胶线栓从颈总动脉插入,经颈动脉分叉进入颈内动脉,使线栓进入颈内动脉,略感阻力后停止进线,整个进线深度约 $8\sim 10\text{ mm}$,尼龙线栓最终到达大脑中动脉,造成大鼠大脑中动脉栓塞。大脑中动脉血流阻断 2 h ,随后拔出线栓至记号处,恢复血流即再灌注 24 h 。其中假手术组除线栓只插入颈内动脉外,其他步骤与模型组一致,术后单笼饲养。各给药组大鼠在缺血 2 h 后即再灌注即刻进行给药,连续给药 3 d 。

造模成功的MCAO/R大鼠,随机分组。具体分组如下:①假手术组(Sham):正常饮食和饮水,每天给予等体积含 3% 聚山梨酯-80的生理盐水溶液;②MCAO/R组(Model):造模成功的MCAO/R大鼠,正常饮食和饮水,每天给予等体积含 3% 聚山梨酯-80的生理盐水溶液;③藁本内酯低剂量组(LIG-L, $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$):造模成功的MCAO/R大鼠,正常饮食和饮水,每天腹腔注射 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 藁本内酯溶液;④藁本内酯高剂量组(LIG-H, $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$):造模成功的MCAO/R大鼠,正常饮食和饮水,每天腹腔注射 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 藁本内酯溶液;⑤NETs抑制剂CI-amidine组(CI-amidine, $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$):造模成功的MCAO/R大鼠,正常饮食和饮水,每天腹腔注射 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ CI-amidine溶液^[1,15]。

2.2 TTC染色 大鼠再灌注 24 h 后迅速取脑,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻约 15 min 便于后续切片,然后将预冷的大脑置于冰上切成大约 $1\sim 2\text{ mm}$ 厚度的冠状切片,再将脑片浸泡在 2% 的TTC染液中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min ,每隔 10 min 翻动1次,确保脑片染色均匀(红色区域为正常脑组织,灰白色区域为脑梗死组织)。染色后,将脑片置于 4% 多聚甲醛溶液中固定过夜,相机拍照,应用Image J软件计算脑梗死体积。脑梗死体积占比=梗死体积/整体脑组织体积 $\times 100\%$ 。

2.3 神经行为学评分 大鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后观察行为学功能。实验按照Longa分级评分法^[16]进行且实验结果均由实验人员不知分组情况下进行。评分标准如下:0分,行为无明显变化,无明显神经功能缺损;1分:左前肢不能完全伸展和屈收,轻度神经功能缺损;2分:行走时向瘫痪侧转圈,有

左侧追尾现象,中度神经功能缺损;3分:行走困难,向瘫痪侧倾倒,重度神经功能缺损;4分:不能自发行走,有意识障碍;5分:死亡。神经行为学评分为 $1\sim 4$ 分者,视为造模成功。

2.4 脑指数测定 大鼠麻醉后,进行腹主动脉取血,取新鲜脑组织,用生理盐水清洗再用滤纸吸干水分,将大脑组织置于天平称量并记录。大鼠脑指数计算公式:脑组织质量(mg)/大鼠总质量(g)。

2.5 流式细胞仪检测中性粒细胞数 采用流式细胞仪检测细胞表面整合素 αM (CD11b)、Ly6G表达。大鼠经造模给药后,各组脑组织制备单细胞悬液, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min (离心半径 10 cm),磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,按照 $0.5\text{ mg}/\text{管}$ 分别加入CD11b和Ly6G抗体。室温孵育 30 min 。孵育完成后,每管加入流式缓冲液 1 mL 。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1\ 700\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min (离心半径 15 cm)以收集细胞。用流式细胞仪检测细胞荧光信号。

2.6 免疫荧光观察CitH3荧光强度 将SD大鼠缺血区脑组织用 4% 多聚甲醛固定 48 h ,经脱水、切片、脱蜡、水化后;将切片浸润于在微波炉里沸腾的 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸钠缓冲液 8 min ,反复2次;再浸润于一抗($1:200$)中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;洗片3次;二抗($1:400$)室温孵育 1 h ;最后加入防淬灭封片剂及DAPI后封片, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存后置置于荧光显微镜下采集图像。

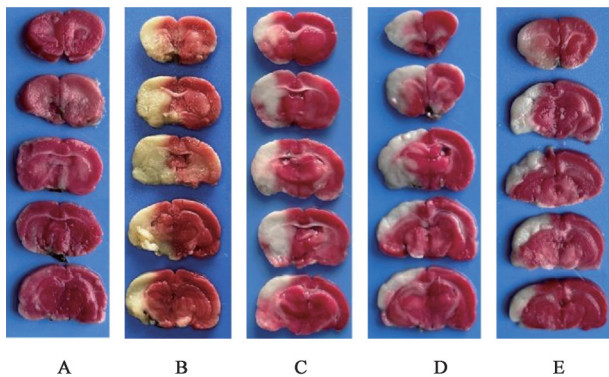
2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Ly6G、Claudin-5、ZO-1、IL-18、IL-1 β 蛋白表达 使用蛋白分离试剂盒提取大鼠缺血区脑组织样本中的总蛋白并使用蛋白定量法(BCA)检测其蛋白浓度确定电泳上样量;经制胶、上样、电泳、转膜、封闭、一抗孵育过夜(Ly6G, $1:500$; ZO-1, $1:1\ 000$; Claudin-5, $1:500$; IL-18, $1:1\ 000$; IL-1 β , $1:1\ 000$)、洗膜、二抗($1:400$)孵育、洗膜,在每条膜上均匀涂抹显色液 $50\text{ }\mu\text{L}$ (现配现用)后放入超灵敏多功能成像仪中显色并采集图像。

2.8 统计学方法 采用GraphPad Prism v8软件进行数据统计分析,实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异性统计采用单因素方差分析及多组分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 藁本内酯减轻MCAO/R大鼠脑组织损伤 采用TTC染色观察大鼠脑梗死体积变化,正常区域脑片呈玫红色,梗死区域脑片呈白色。CI-amidine作为NETs抑制剂,可通过抑制肽基精氨酸脱亚胺酶4

(PAD4)活性阻断NETs形成。本研究设置该抑制剂组,旨在考察藁本内酯的神经保护作用是否与抑制NETs相关。结果显示,模型组大鼠缺血侧的脑组织白色区域明显增多,提示模型组大鼠梗死区域显著增加,与模型组比较,LIG-L、LIG-H组及CI-amidine组大鼠缺血侧白色梗死灶区域明显减少,表明藁本内酯可有效减少缺血侧大脑的梗死体积,抑制梗死灶的扩大。与模型组比较,LIG-L、LIG-H组及CI-amidine组大鼠的神经功能评分和脑指数显著降低($P<0.01$)。以上结果表明藁本内酯能够减轻MCAO/R大鼠的脑组织损伤,这种神经保护作用可能与抑制NETs释放有关。见图1、表1。



注: A. Sham组; B. Model组; C. LIG-L组; D. LIG-H组; E. CI-amidine组(图2-图5同)

图1 藁本内酯对MCAO/R大鼠TTC染色的影响
Fig. 1 Effect of LIG on TTC staining of MCAO/R rats

表1 藁本内酯对MCAO/R大鼠脑组织损伤的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	脑梗死体积 (n=3)/%	神经功能评分 (n=10)/分	脑指数 (n=10)/mg·g ⁻¹
Sham组		0.00±0.00	0.00±0.00	5.68±0.16
Model组		45.63±2.33 ¹⁾	2.80±0.40 ¹⁾	7.02±0.10 ¹⁾
LIG-L组	20	23.78±2.21 ²⁾	2.00±0.60 ²⁾	6.29±0.14 ²⁾
LIG-H组	40	18.10±1.52 ²⁾	1.30±0.50 ²⁾	6.01±0.08 ²⁾
CI-amidine组	10	15.78±1.57 ²⁾	1.20±0.40 ²⁾	5.98±0.09 ²⁾

注:与Sham组比较¹⁾ $P<0.05$;与Model组比较²⁾ $P<0.01$ (表2-表5同)

3.2 藁本内酯抑制了MCAO/R大鼠中性粒细胞数
与Sham组比较,Model组中性粒细胞数明显增多($P<0.05$);与Model组比较,LIG-L、LIG-H组及CI-amidine组中性粒细胞数显著下降($P<0.01$)。见图2、表2。

3.3 藁本内酯抑制MCAO/R大鼠中性粒细胞诱导的NETs的释放 免疫荧光观察NETs形成过程中的关键蛋白CitH3,结果显示,与Sham组比较,

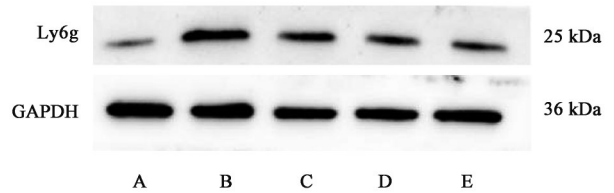


图2 MCAO/R大鼠Ly6G蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of Ly6G protein expression of MCAO/R rats

表2 藁本内酯对MCAO/R大鼠中性粒细胞募集的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)

Table 2 Effect of LIG on neutrophil recruitment of MCAO/R rats ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	中性粒细胞/%	LY6G/GAPDH
Sham组		8.49±1.65	0.44±0.04
Model组		49.15±2.80 ¹⁾	1.33±0.08 ¹⁾
LIG-L组	20	33.70±3.00 ²⁾	0.98±0.07 ²⁾
LIG-H组	40	25.77±1.62 ²⁾	0.71±0.04 ²⁾
CI-amidine组	10	19.14±2.63 ²⁾	0.60±0.07 ²⁾

Model组大鼠代表绿色的CitH3的荧光强度明显增强($P<0.05$),表明脑缺血再灌注发生诱导了NETs的释放。与Model组比较,LIG-L、LIG-H组给药后CitH3的荧光强度显著降低($P<0.01$),由此表明藁本内酯可以抑制MCAO/R大鼠中性粒细胞诱导的NETs的释放。见图3、表3。

3.4 藁本内酯对NETs的抑制减轻了MCAO/R大鼠血脑屏障的损伤 研究表明,在IS发生时,中性粒细胞的表达与血脑屏障破坏呈正相关^[17-18]。由此对血脑屏障相关的紧密连接蛋白Claudin-5、ZO-1进行检测。结果可见,与Sham组比较,Model组大鼠Claudin-5、ZO-1蛋白表达明显降低($P<0.05$);与Model组比较,LIG-L、LIG-H组及CI-amidine组蛋白表达显著升高($P<0.01$),结果表明藁本内酯可以减轻MCAO/R大鼠的血脑屏障损伤,该保护作用可能与抑制NETs的释放有关。见图4、表4。

3.5 藁本内酯对NETs的抑制减轻了MCAO/R大鼠的神经炎症 与Sham组比较,Model组IL-1 β 和IL-18的蛋白表达明显升高($P<0.05$);与Model组比较,LIG-L、LIG-H组及CI-amidine组IL-1 β 和IL-18的蛋白表达显著降低($P<0.01$)。见图5、表5。

4 讨论

中枢神经系统的免疫调节在IS后的病理生理过程起到至关重要的作用,参与IS发生发展的全过程^[19-20]。中性粒细胞是血液中最丰富的免疫细胞,是细胞防御的第一道防线^[21]。在IS发生时,中性粒

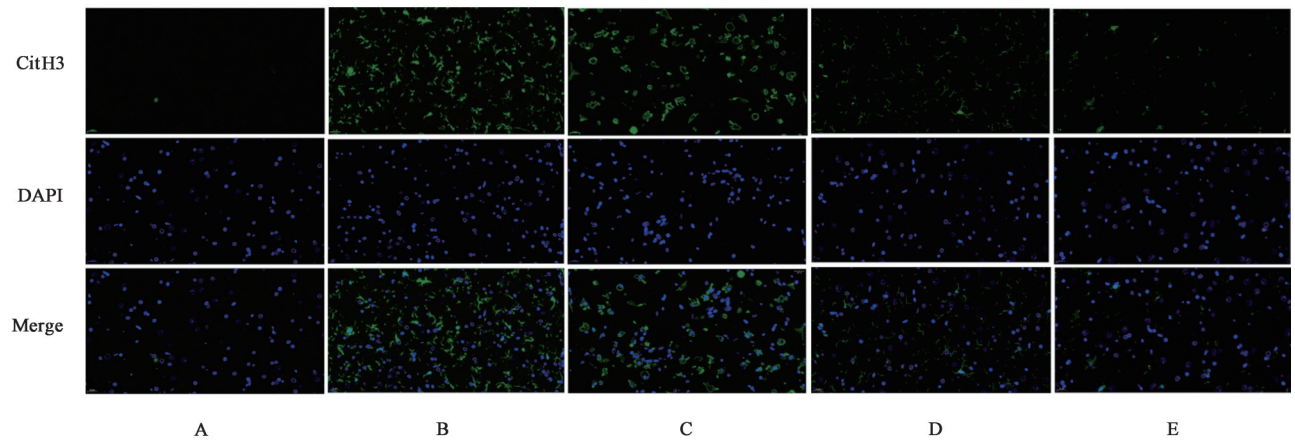


图3 藁本内酯对MCAO/R大鼠CitH3荧光强度的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 3 Effect of LIG on fluorescence intensity of CitH3 (IF, ×200)

表3 藁本内酯对MCAO/R大鼠CitH3荧光强度的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Effect of LIG on fluorescence intensity of CitH3 of MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CitH3 荧光强度
Sham组		0.19±0.06
Model组		1.05±0.06 ¹⁾
LIG-L组	20	0.88±0.07 ²⁾
LIG-H组	40	0.40±0.07 ²⁾
CI-amidine组	10	0.33±0.08 ²⁾

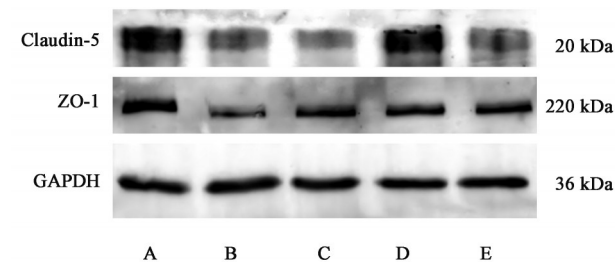


图4 MCAO/R大鼠紧密连接相关蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of tight junction proteins expression of MCAO/R rats

表4 藁本内酯对MCAO/R大鼠紧密连接相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of LIG on expression of tight junction proteins of MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ZO-1/GAPDH	Claudin-5/GAPDH
Sham组		0.83±0.09	1.37±0.09
Model组		0.35±0.07 ¹⁾	0.32±0.07 ¹⁾
LIG-L组	20	0.57±0.03 ²⁾	0.56±0.02 ²⁾
LIG-H组	40	0.67±0.06 ²⁾	0.97±0.14 ²⁾
CI-amidine组	10	0.72±0.06 ²⁾	0.93±0.09 ²⁾

细胞的大量涌入与脑组织损伤的严重程度存在着直接的联系^[22]。作为内源性细胞,中性粒细胞(NUS)天生具备炎症趋化性和跨血脑屏障能力,是

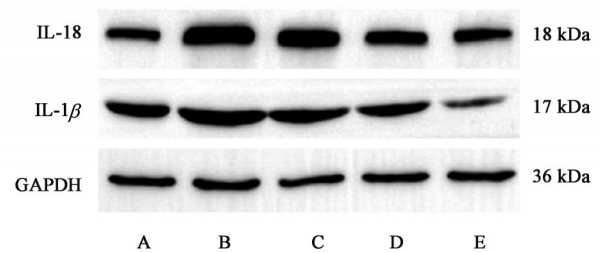


图5 MCAO/R大鼠IL-18、IL-1β蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of IL-18, IL-1β protein expression of MCAO/R rats

表5 藁本内酯对MCAO/R大鼠IL-18、IL-1β蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of LIG on IL-18, IL-1β protein expression of MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-18/GAPDH	IL-1β/GAPDH
Sham组		0.43±0.09	0.55±0.06
Model组		1.36±0.07 ¹⁾	1.30±0.09 ¹⁾
LIG-L组	20	1.04±0.06 ²⁾	0.83±0.03 ²⁾
LIG-H组	40	1.03±0.07 ²⁾	0.61±0.13 ²⁾
CI-amidine组	10	0.74±0.10 ²⁾	0.50±0.06 ²⁾

IS早期浸润受损脑组织的“第一反应者”,并产生促炎因子、基质金属蛋白酶(MMP)、一氧化氮、活性氧(ROS)和其他加速脑损伤的细胞毒性分子^[23-24],最终可能导致缺血后血脑屏障破坏和梗死面积的进一步扩大,介导神经元凋亡等^[25]。本研究初步发现藁本内酯对中性粒细胞具有抑制作用。

IS发生时,NUS被活化,导致多种蛋白酶移至NUS细胞核内,将NUS细胞核内染色质释放到NUS胞外,形成网状结构的NETs,进一步吞噬杀灭其他病原体,修复损伤,是对抗感染条件的额外防御机制^[26]。尽管NETs有助于在感染期间清除病原体^[27-28],但过度NETs的释放会加重炎症反应和继发

性组织损伤。IS发生早期,中性粒细胞向缺血部位浸润,并进一步诱导NETs的产生,诱导胶质细胞活化激活炎症反应,同时,NETs导致炎症介质如ROS、脂质运载蛋白-2(Lipopocalin-2)、髓过氧化物酶(MPO)、MMP-9的释放,以及紧密连接蛋白(Claudin-5、Occludin和ZO-1)的减少,导致缺血性脑损伤后血脑屏障通透性的增加和破坏^[29-32]。而NETs和中性粒细胞弹性蛋白酶的抑制,可以抑制血脑屏障通透性的增加和缺血性脑损伤^[33-34]。临床上,也已在缺血性卒中患者脑组织中发现了形成NETs的中性粒细胞,同时血浆NETs标记物升高与卒中预后不良相关,并可以作为IS早期诊断的标志物^[35-36]。提示,靶向NETs可能成为IS治疗的新方向。

本研究通过加入NETs抑制剂CI-amidine作为阳性对照^[1],观察脑缺血再灌注大鼠模型中性粒细胞形成的NETs扮演的角色及藁本内酯的干预作用。免疫荧光可见,大鼠缺血后NETs形成标志物CitH3荧光强度显著增强,流式细胞术及Western blot结果显示中性粒细胞标志物Ly6G的表达亦显著增加,同时伴有血脑屏障损伤和炎症反应,而藁本内酯不同剂量干预后降低了CitH3的荧光强度,下调了Ly6G蛋白的表达,改善血脑屏障损伤及炎症损伤。以上结果提示脑缺血再灌注发生时,中性粒细胞被活化并进一步形成NETs,藁本内酯可以抑制中性粒细胞含量和NETs的形成,并进一步修复血脑屏障,减轻神经炎症,这可能是藁本内酯减轻缺血后脑组织损伤可能的作用机制。本研究以NETs为IS新的研究对象,致力于寻找治疗脑缺血再灌注损伤后血脑屏障损伤修复和神经功能损伤修复的新靶点,为后续开发新神经保护剂提供有价值的参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] KANG L, YU H, YANG X, et al. Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):2488.

[2] HOU J, YANG X, LI S, et al. Accessing neuroinflammation sites: Monocyte/neutrophil-mediated drug delivery for cerebral ischemia[J]. Sci Adv, 2019, 5(7):eaau8301.

[3] IADECOLA C, BUCKWALTER M S, ANRATHER J. Immune responses to stroke: Mechanisms, modulation, and therapeutic potential[J]. J Clin Invest, 2020, 130(6):2777-2788.

[4] FUCHS T A, ABED U, GOOSMANN C, et al. Novel cell

death program leads to neutrophil extracellular traps[J]. J Cell Biol, 2007, 176(2):231-241.

[5] MISTRY P, KAPLAN M J. Cell death in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis[J]. Clin Immunol, 2017, 185:59-73.

[6] ZHANG S, CAO Y, DU J, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to tissue plasminogen activator resistance in acute ischemic stroke[J]. FASEB J, 2021, 35(9):e21835.

[7] 龙宇,张定堃,郑川,等. 川芎治疗脑卒中的理论溯源及研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(18):6372-6382.

LONG Y, ZHANG D K, ZHENG C, et al. Theoretical tracing of the origin and research progress on Chuanxiong in treatment of stroke[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(18):6372-6382.

[8] 严少博,刘霞,王永利,等. 川芎对神经系统疾病的作用机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2025, doi: 21.1546.R.20250704.1602.016.

YAN S B, LIU X, WANG Y L, et al. Mechanism of Chuanxiong in neurological diseases[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2025, doi:21.1546.R.20250704.1602.016.

[9] LI L, WANG N, JIN Q, et al. Protection of Tong-Qiao-Huo-Xue decoction against cerebral ischemic injury through reduction blood-brain barrier permeability[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2017, 65(11):1004-1010.

[10] WU S, WANG N, LI J, et al. Ligustilide ameliorates the permeability of the blood-brain barrier model *in vitro* during oxygen-glucose deprivation injury through HIF/VEGF pathway[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2019, 73(5):316-325.

[11] MAO Z, TIAN L, LIU J, et al. Ligustilide ameliorates hippocampal neuronal injury after cerebral ischemia reperfusion through activating PINK1/Parkin-dependent mitophagy[J]. Phytomedicine, 2022, 101:154111.

[12] 吴倩,刘娇,田丽宇,等. 藁本内酯介导的线粒体自噬减轻HT22细胞的缺糖缺氧/复氧损伤[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(7):1897-1903.

WU Q, LIU J, TIAN L Y, et al. Ligustilide-mediated mitophagy alleviates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury in HT22 cells[J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(7):1897-1903.

[13] WU Q, LIU J, MAO Z, et al. Ligustilide attenuates ischemic stroke injury by promoting Drp1-mediated mitochondrial fission via activation of AMPK[J]. Phytomedicine, 2022, 95:153884.

[14] ZHU W L, ZHENG J Y, CAI W W, et al. Ligustilide improves aging-induced memory deficit by regulating mitochondrial related inflammation in SAMP8 mice[J]. Aging, 2020, 12(4):3175-3189.

[15] PENG D, QIAO H Z, TAN H Y, et al. Ligustilide ameliorates cognitive impairment via AMPK/SIRT1 pathway in vascular dementia rat[J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(5):1401-1414.

[16] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without

- craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [17] TANG N, GONG X R, HUANG H, et al. Activated neutrophil-derived exosomes contribute to blood-brain barrier damage and hemorrhagic transformation after cerebral ischemia/reperfusion[J]. *Brain Res*, 2023, 1810:148374.
- [18] QIU Y M, ZHANG C L, CHEN A Q, et al. Immune cells in the BBB disruption after acute ischemic stroke: Targets for immune therapy?[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:678744.
- [19] TUTTOLOMONDO A, MAIDA C, PINTO A. Inflammation and inflammatory cell recruitment in acute cerebrovascular diseases[J]. *Curr Immunol Rev*, 2015, 11(1):24-32.
- [20] MALONE K, AMU S, MOORE A C, et al. Immunomodulatory therapeutic strategies in stroke[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:630.
- [21] SILVESTRE-ROIG C, BRASTER Q, ORTEGA-GOMEZ A, et al. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(6):327-340.
- [22] CHOU M L, BABAMALE A O, WALKER T L, et al. Blood-brain crosstalk: The roles of neutrophils, platelets, and neutrophil extracellular traps in neuropathologies[J]. *Trends Neurosci*, 2023, 46(9):764-779.
- [23] ENDRES M, MORO M A, NOLTE C H, et al. Immune pathways in etiology, acute phase, and chronic sequelae of ischemic stroke[J]. *Circ Res*, 2022, 130(8):1167-1186.
- [24] NEUMANN J, RIEK-BURCHARDT M, HERZ J, et al. Very-late-antigen-4 (VLA-4) -mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(2):259-277.
- [25] PENA-MARTINEZ C, DURAN-LAFORET V, GARCIA-CULEBRAS A, et al. Pharmacological modulation of neutrophil extracellular traps reverses thrombotic stroke tPA (tissue-type plasminogen activator) resistance [J]. *Stroke*, 2019, 50(11):3228-3237.
- [26] THANABALASURIAR A, SCOTT B N V, PEISELER M, et al. Neutrophil extracellular traps confine *Pseudomonas aeruginosa* ocular biofilms and restrict brain invasion[J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(4):526-536. e4.
- [27] SONG Z, HUANG G, CHIQUETTO PARACATU L, et al. NADPH oxidase controls pulmonary neutrophil infiltration in the response to fungal cell walls by limiting LTB4[J]. *Blood*, 2020, 135(12):891-903.
- [28] WANROOY B J, WEN S W, WONG C H. Dynamic roles of neutrophils in post-stroke neuroinflammation [J]. *Immunol Cell Biol*, 2021, 99(9):924-935.
- [29] CHEN C, HUANG T, ZHAI X, et al. Targeting neutrophils as a novel therapeutic strategy after stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(9):2150-2161.
- [30] XU X, WU Y, XU S, et al. Clinical significance of neutrophil extracellular traps biomarkers in thrombosis [J]. *Thromb J*, 2022, 20(1):63.
- [31] KIM S W, LEE H, LEE H K, et al. Neutrophil extracellular trap induced by HMGB1 exacerbates damages in the ischemic brain[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7(1):94.
- [32] 董一蕾, 李珺媛, 张业昊, 等. 缺血性脑卒中免疫炎症机制及中医药干预研究进展[J]. *世界中医药*, 2024, 19(02):291-297.
- DOND Y L, LI J Y, ZHANG Y H, et al. Advances in the study of immunoinflammatory mechanisms and treatment of Chinese medicine in ischemic stroke [J]. *World Chin Med*, 2024, 19(02):291-297.
- [33] WANG R, ZHU Y, LIU Z, et al. Neutrophil extracellular traps promote tPA-induced brain hemorrhage via cGAS in mice with stroke[J]. *Blood*, 2021, 138(1):91-103.
- [34] SUN S, LV W, LI S, et al. Smart liposomal nanocarrier enhanced the treatment of ischemic stroke through neutrophil extracellular traps and cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase-stimulator of interferon genes (cGAS-STING) pathway inhibition of ischemic penumbra[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(18):17845-17857.
- [35] FANG H, BO Y, HAO Z, et al. A promising frontier: Targeting NETs for stroke treatment breakthroughs [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1):238.
- [36] DENORME F, PORTIER I, RUSTAD J L, et al. Neutrophil extracellular traps regulate ischemic stroke brain injury [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(10):e154225.

[责任编辑 周冰冰]